

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb191/161 | POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER | |
| Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01946 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/07/2000 | (Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 06/07/1999 |
| Déposant COMPAGNIE GERVAIS DANONE | | |

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 00/01946

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A23C9/123

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, FSTA, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| X | US 5 711 977 A (CHEN MEI-CHING ET AL) 27 janvier 1998 (1998-01-27) colonne 6, ligne 36 - ligne 39; revendications 7-9; exemples 2,6 --- | 1-9 |
| X | DATABASE WPI Section Ch, Week 200002 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 2000-021383 XP002132839 & PH 29 583 A (PHAM C B), 1 avril 1996 (1996-04-01) abrégé --- | 1,3,4, 6-9 |
| X | FR 2 506 129 A (VERWALTUNG ORGANI ETS) 26 novembre 1982 (1982-11-26) exemple I --- | 1,4,6,8 |
| A | --- | 5,7 |
| | --- -/-- | |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Saunders, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 00/01946

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | EP 0 577 904 A (NESTLE SA) 12 janvier 1994 (1994-01-12) revendications 1,5,7,8; exemples --- | 1,2,6-9 |
| A | US 5 902 578 A (HALPIN-DOHNALEK MARGARET IONE ET AL) 11 mai 1999 (1999-05-11) colonne 4, ligne 9 - ligne 12 colonne 4, ligne 50 - ligne 56; revendications 1,4 --- | 1,2,6-9 |
| A | FR 2 560 046 A (SCHULER RUDOLF) 30 août 1985 (1985-08-30) exemples ----- | 1,3,6-9 |



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/01946

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 5711977 | A | 27-01-1998 | JP 3017687 B JP 9322762 A | 13-03-2000 16-12-1997 |
| PH 29583 | A | | NONE | |
| FR 2506129 | A | 26-11-1982 | DE 3120505 A BE 533031 A CA 1166065 A CH 315992 A DE 968860 C FR 1111483 A GB 795345 A JP 1030458 B JP 1547476 C JP 58076045 A NL 93350 C NL 8202045 A, B, US 2866470 A US 4435432 A | 09-12-1982 24-04-1984 27-02-1956 20-06-1989 28-02-1990 09-05-1983 16-12-1982 30-12-1958 06-03-1984 |
| EP 0577904 | A | 12-01-1994 | AT 153063 T AT 172245 T AU 673525 B AU 4158793 A CA 2099856 A CZ 9301343 A DE 69219768 D DK 577904 T EP 0768375 A ES 2102485 T FI 933002 A GR 3024219 T HK 1000143 A HU 68567 A IE 80629 B JP 2916350 B JP 6315373 A NO 932408 A NZ 248057 A PL 299542 A RO 115175 A RU 2126446 C SK 71293 A US 5494664 A US 5603930 A | 15-05-1997 15-10-1998 14-11-1996 13-01-1994 07-01-1994 16-02-1994 19-06-1997 27-10-1997 16-04-1997 01-08-1997 07-01-1994 31-10-1997 24-12-1997 28-06-1995 21-10-1998 05-07-1999 15-11-1994 07-01-1994 28-08-1995 21-02-1994 30-11-1999 20-02-1999 06-07-1994 27-02-1996 18-02-1997 |
| US 5902578 | A | 11-05-1999 | WO 9735596 A | 02-10-1997 |
| FR 2560046 | A | 30-08-1985 | DE 3406772 A CH 665126 A | 13-03-1986 29-04-1988 |



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
11 janvier 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/01785 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: A23C 9/123

(FR) ~~CONTIER~~, Charles [FR/FR]; 8 bis, rue Aliénor
d'Aquitaine, F-19360 Malemort-sur-Corrèze (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01946

(74) Mandataires: **VIALLE-PRESLES, Marie-José** etc.;
Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 6 juillet 2000 (06.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:

99/08691

6 juillet 1999 (06.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): **COM-
PAGNIE GERVAIS DANONE** [FR/FR]; 126-130, rue
Jules Guesde, F-92302 Levallois-Perret (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **BLAREAU,**
Jean-Pierre [FR/FR]; 65, rue de Cassel, F-59114 Steenvo-
orde (FR), **ROMOND, Marie-Bénédicte** [FR/FR]; 13-14,
résidence des Andélys, Parc St Maur, F-59800 Lille (FR).
ROMOND, Charles [FR/FR]; 21, avenue du Maréchal
Leclerc, F-59110 La Madeleine (FR). **LECROIX, Francis**
[FR/FR]; 244, rue Henri Bailleu, F-59270 Godewaersvelde

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 01/01785 A1

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF AN IMMUNOSTIMULANT MILK PRODUCT AND USES THEREOF

(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION D'UN PRODUIT LACTE IMMUNOSTIMULANT ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract: A method for the production of an immunostimulant milk product, characterized in that bioconversion is carried out on or a milk substrate with the aid of a *Bifidobacterium* culture by keeping said substrate in contact with said culture in conditions which are unfavorable with respect to the fermentation of *Bifidobacterium*. The invention also relates to milk foods and products obtained by said method.

(57) Abrégé: Procédé de préparation d'un produit lacté immunostimulant, caractérisé en ce que l'on effectue la bioconversion d'un substrat laitier à l'aide d'une culture de *Bifidobacterium*, par maintien dudit substrat en contact avec ladite culture, dans des conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium*. Produits et aliments lactés obtenus à l'aide dudit procédé.



PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN PRODUIT LACTÉ IMMUNOSTIMULANT
ET SES APPLICATIONS

La présente invention est relative à l'utilisation de bifidobactéries pour la préparation d'aliments lactés immunostimulants convenant en particulier à l'alimentation infantile : aliments pouvant être sous forme liquide ou poudre.

Le genre *Bifidobacterium* fait partie de la famille des Actinomycetaceae ; il regroupe des bacilles à Gram positif, anaérobies stricts, fermentant le glucose par la voie de la fructose 6-phosphate phosphocétolase. Leur pH optimal de croissance est compris entre 6 et 7, et leur température optimale de croissance est comprise entre 37 et 40°C.

Les bifidobactéries font partie de la flore intestinale humaine normale, et on leur reconnaît de nombreux effets bénéfiques pour la santé. Il est notamment connu que les nourrissons alimentés au sein, qui possèdent une flore intestinale dans laquelle les bifidobactéries prédominent, résistent mieux aux infections et présentent notamment un risque de diarrhée plus faible que les nourrissons nourris avec des préparations lactées industrielles.

Le rôle des bifidobactéries dans cette résistance accrue aux infections n'a pas été complètement élucidé. Différentes études indiquent qu'elles possèdent un pouvoir immunostimulant qui impliquerait des substances polysaccharidique associées à la paroi bactérienne, ou sécrétées par les bactéries au cours de la fermentation anaérobie GOMEZ et al., [FEMS Microbiol. Lett., 56, 47-52, (1988), décrivent l'effet immunomodulateur de fractions exocellulaires riches en polysaccharides produites par *Bifidobacterium adolescentis* ; la Demande FR publiée sous le numéro 2652590, au nom des Laboratoires OM, décrit un exopolymère immunopotentiateur de nature

polysaccharidique produit par *Bifidobacterium infantis longum* ; HOSONO et al., [Biosci. Biotech. Biochem., 61, 312-316 (1997) et Bioscience Microflora, 17, 97-104, (1998)], décrivent des polysaccharides immunopotentiateurs
5 produits par différentes espèces de *Bifidobacterium*. L'action immunomodulatrice des bifidobactéries se manifeste également par la régulation de la microflore intestinale, en particulier au détriment du développement d'espèces bactériennes pathogènes. ROMOND et al.
10 [Anaerobe, 3, 137-143, (1997), et J. Dairy Sci., 81, 1229-1235, (1998)] décrivent ainsi des fractions riches en glycoprotéines, produites par *Bifidobacterium breve* en conditions de fermentation anaérobie, et induisant *in vivo* un effet régulateur de la microflore intestinale.

15 On trouve sur le marché de nombreux produits fermentés par des bifidobactéries, éventuellement associées à d'autres bactéries lactiques, et dont l'ingestion permet de bénéficier des effets immunostimulants des bifidobactéries et de leurs produits
20 de fermentation.

Dans le cas de l'alimentation infantile, cependant, ceux-ci ont l'inconvénient d'être trop acides et de présenter, notamment dans le cas des produits en poudre, un aspect non-homogène après reconstitution, du
25 fait de la coagulation des protéines du lait par l'acidité générée lors de la fermentation. Ils sont donc parfois mal acceptés par l'enfant et par la mère.

Or, les Inventeurs ont maintenant découvert que la production par des bifidobactéries, de substances
30 dotées de propriétés immunostimulantes pouvait s'effectuer sans fermentation, et donc sans acidification du produit final.

La présente Invention a pour objet un procédé de préparation d'un produit lacté immunostimulant,
35 caractérisé en ce que l'on effectue la bioconversion d'un substrat laitier à l'aide d'une culture de

Bifidobacterium, par maintien dudit substrat en contact avec ladite culture, dans des conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium*.

On définit par « conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium* » des conditions dans lesquelles l'acidification du milieu par *Bifidobacterium* n'excède pas 0,5 unités pH en 8 heures d'incubation pour un ensemencement initial 1 à 5×10^7 UFC par ml. Elles peuvent aisément être déterminées par l'homme de l'art à l'aide de simples essais, en faisant varier notamment l'aération du milieu de culture, sa pression osmotique et/ou la température de culture, et en mesurant le pH en début et en fin de culture.

Pour un grand nombre de souches de *Bifidobacterium*, de telles conditions peuvent notamment être obtenues par :

- le maintien en conditions aérobies, par exemple sous agitation ;
- le maintien du milieu à une pression osmotique correspondant à 0,93 à 0,97 d'activité de l'eau (AW) ;
- le maintien à une température de 40 à 48°C ;

ainsi que des combinaisons de ces différentes conditions.

La mise en contact du substrat laitier et des *Bifidobacterium* peut être effectuée à raison de 1×10^7 à 1×10^9 UFC par ml de substrat laitier, et la population finale de *Bifidobacterium* à l'issue de la réaction de bioconversion est de 1×10^5 à 1×10^9 UFC par ml de produit.

Le pH du substrat laitier lors de la mise en contact avec les bactéries est de préférence de 6,3 à 7 et le pH du produit à l'issue de la réaction de bioconversion est préférentiellement de 6 à 7.

Selon les conditions utilisées, le temps de contact entre le substrat laitier et les bactéries sera de 6 à 24 heures.

Le substrat laitier peut être du lait, ou tout milieu à base de lait ; il peut s'agir par exemple d'un concentré de lait, d'une base pour aliment lacté infantile, d'une base pour yoghourt, etc...

On peut ajouter au milieu à base de lait les ingrédients nécessaires à la réalisation du produit prêt à consommer que l'on souhaite obtenir. Si par exemple on souhaite obtenir un aliment lacté pour nourrissons, on ajoutera du lactose, des malto-dextrines, des minéraux, des vitamines, des matières grasses, les ingrédients permettant de reconstituer la composition du lait maternel. Si on le souhaite, les matières grasses sont incorporées, puis homogénéisées avec la solution de manière à obtenir une émulsion stable.

Une souche de *Bifidobacterium breve* convenant particulièrement à la mise en œuvre de l'invention, a été déposée selon le Traité de Budapest, le 31 mai 1999, sous le numéro I-2219 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris.

Cette souche possède les caractéristiques suivantes :

Morphologie : bacilles courts avec rares formes en Y et V

Métabolisme : anaérobie ; production d'acides acétique et lactique L(+)

Fermentation des sucres : glucose, galactose, fructose, maltose, saccharose, lactose, esculine, ribose, mannitol, sorbitol, D raffinose, mélibiose.

La présente invention a également pour objet un produit lacté liquide caractérisé en ce qu'il peut être obtenu en mettant en œuvre un procédé conforme à l'invention.

Ce produit présente de préférence, à l'issue de la réaction de bioconversion, un pH de 6 à 7.

A titre de comparaison, les produits de l'art antérieur obtenus par fermentation par *Bifidobacterium* ont, en fin de fermentation un pH de 4 à 4,6.

Ce produit peut être consommé tel quel, ou subir différents traitements, dont la nature varie selon le produit prêt à consommer que l'on souhaite obtenir. Il peut par exemple être additionné d'agents de texture, de saveur, de suppléments vitaminiques ou minéraux, de matières grasses, etc..., si ceux-ci n'ont pas été ajoutés dans le milieu initial. Il peut également être concentré ou dilué.

Un produit lacté conforme à l'invention peut servir de base pour la préparation d'aliments lactés frais.

Avantageusement, il peut également être utilisé pour la préparation, par stérilisation et/ou déshydratation, d'aliments de longue conservation. En effet, il conserve ses propriétés immunostimulantes même en l'absence de bactéries vivantes, par exemple après dessiccation et stérilisation UHT.

La présente invention englobe également les aliments lactés frais, stérilisés, ou déshydratés obtenus à partir d'un produit lacté conforme à l'invention.

Elle englobe aussi les aliments lactés reconstitués obtenus par addition d'eau aux aliments lactés déshydratés conformes à l'invention.

Les aliments lactés (frais, stérilisés, ou reconstitués) conformes à l'invention ont généralement un pH de 6 à 7,5, de préférence de 6,5 à 6,9.

Contrairement aux aliments résultant de la fermentation par *Bifidobacterium* connus dans l'art antérieur, les aliments lactés conformes à l'invention ne sont pas acides, et contiennent les protéines du lait sous forme soluble, non-coagulée. Par addition d'eau aux

aliments lactés déshydratés conformes à l'invention on peut ainsi obtenir un produit homogène, sans précipitation ou séparation de phase.

Les aliments lactés conformes à l'invention, de par leur effet immunostimulant, confèrent une protection contre les infections microbiennes et virales comparable à celle des aliments résultant de la fermentation par *Bifidobacterium* connus dans l'art antérieur, sans présenter les inconvénients de ces derniers en termes de modification du goût et de l'aspect du produit. Ils sont particulièrement bien adaptés à l'alimentation infantile, et notamment à l'alimentation des nourrissons, mais peuvent également être utilisés pour l'alimentation de sujets de tous âges.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de produits lactés conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : FABRICATION D'UNE PREPARATION LACTEE DIETETIQUE POUR NOURRISSONS, EN POUDRE, A ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE

On prépare un concentré de lait, dont la composition, exprimée en g pour 100 g de matières sèches, est la suivante :

| | | |
|----|-----------------------------------------------------------------|-------|
| 25 | Protéines de lait (80% de caséine et 20% de protéines de sérum) | 13 |
| | Matière grasse végétale | 25,5 |
| | Lactose | 42,25 |
| | Malto-Dextrines | 16 |
| 30 | Minéraux | 3 |
| | Vitamines | 0,25 |

On ajoute la matière grasse végétale à un lait de vache écrémé, chauffé à 75°C. On homogénéise à la même température en 2 étapes, la première sous 200 kgs/cm², la seconde sous 50 kgs/cm². On ajoute ensuite le lactose et les malto-dextrines, préalablement mis en solution dans l'eau, puis les solutions de vitamines et de minéraux.

Le mélange final est pasteurisé à 115°C, puis concentré par évaporation à 48% de matière sèche.

Le concentré refroidi à 37°C est ensuite ensemencé à raison de 5% avec une culture de *B. breve* I-2219 contenant 10⁹ bactéries/ml. Le pH initial est de 6,15 et la pression osmotique est de 0,96.

Après incubation pendant 8 h à 37°C, dans un tank sous air avec agitation périodique 10 minutes toutes les 2 heures, le pH est de 6,1 et la population de *B. breve* est de 10⁶ bactéries/ml. L'acidité Dornic est de 48°D.

Le concentré est séché par atomisation. La poudre obtenue, additionnée de l'eau à raison de 140 g pour un litre d'eau permet d'obtenir un lait reconstitué qui possède les caractéristiques suivantes : pH 6,6, acidité Dornic 12°D ; aspect de lait liquide sans grains de caillé.

EXEMPLE 2 : FABRICATION D'UNE PREPARATION LACTEE DIETETIQUE POUR NOURRISSONS, A ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE, PRETE A L'EMPLOI, STERILISEE UHT ET CONDITIONNEE ASEPTIQUEMENT

On prépare un mélange dont la composition (en g/litre), est la suivante :

| | |
|-------------------|------|
| Protéines | 21 |
| 25 Matière grasse | 24 |
| Glucides | 83 |
| Minéraux | 5 |
| Vitamines | 0,45 |

Ce mélange est préparé à partir des ingrédients suivants (pour 100 litres de produit fini) :

- 58 litres de lait écrémé,
- 2,4 kgs de matière grasse,
- 4,7 kgs de lactose,
- 0,7 kgs de malto-dextrines,
- 35 - 0,3 kg de vitamines,
- 0,05 kg un complexe minéral.

Le lait est au préalable traité thermiquement en système UHT à une température de 115 à 120°C.

Dans le lait refroidi à 70°C, on incorpore la matière grasse et on procède à une homogénéisation en 2 étapes, 200 kgs/ au cours de la 1^{ère} étape, 50 kgs à la 2^{ème} étape.

Le mélange est refroidi à 37 - 38°C, puisensemencé à 1,5% avec une culture de CNCM I-2219 contenant 1 à 5 x 10⁹ bactéries/ml.

On incube à 37°C pendant 8 heures dans les conditions indiquées à l'exemple 1 ci-dessus, puis on procède au refroidissement, à 5°C.

Le pH du produit est de 6,3 et la population de *B. breve* est de 3 x 10⁷ bactéries/ml. L'acidité Dornic est de 23°D.

Le reste des ingrédients est dissout dans 50 litres d'eau d'environ puis ajouté au produit obtenu à l'issue de l'incubation.

Le mélange ainsi réalisé est soumis à un traitement UHT à 140°C pendant 6 à 7 secondes avant d'être conditionné aseptiquement.

EXEMPLE 3 : EFFET IMMUNOSTIMULANT DE PRODUITS LACTES CONFORMES A L'INVENTION

L'effet immunostimulant des préparations lactées conformes à l'invention a été étudié comme suit :

- par l'évolution de flore fécale sur des souris à flore humaine ;
- par la régulation du phénomène de translocation sur des souris monoxéniques à *Clostridium perfringens*.

Etudes de l'évolution de la flore fécale chez les souris à flore humaine :

Les souris sont de la lignée C3H à flore humaine adulte.

Il s'agit de la génération G1, la génération G0 étant des souris axéniques associées à l'âge adulte à la flore humaine.

- Nombre de souris par lot : 6
- Nombre d'essais : 2 par produit.

Les souris sont gardées 1 semaine dans une même cage puis réparties à raison de 6 par cage.

L'âge des souris au début des essais est de 8 semaines minimum à 11 semaines maximum.

Seront suivis dans la flore fécale :

- les Bifidobactéries
- les *Bactéroïdes Fragilis*
- les spores de *Clostridia*
- les spores de *Cl. perfringens* éventuellement

15 Techniques microbiologiques

L'échantillon fécal est prélevé extemporanément, pesé aseptiquement et dilué en solution préréduite de RINGER (diluée au quart et supplémentée en chlorhydrate de cystéine à 0,3 g/l).

Dénombrement des bifidobactéries et des bactéroïdes fragilis sur milieux préréduits de BEERENS et BBE ensemencés directement et incubés en anaérobiose.

Pour la recherche des spores de *Clostridium* :

- les suspensions sont chauffées 10 minutes à 75°C et ensemencées sur gélose Columbia supplémentée en glucose (5 g/l) et chlorhydrate de cystéine (0,3 g/l) et incubées 5 jours,

- les colonies de *Clostridium* sont repérées par leur morphologie et une réaction négative à la catalase. La morphologie cellulaire est déterminée après coloration Gram 3.

Les Résultats obtenus avec une préparation lactée témoin ayant été ensemencée avec le ferment CNCM I-2219 et administrée immédiatement sont illustrés par le Tableau I ci-dessous (temps de contact = 0)

Tableau I

| | T O | T 7 jours | T 15 jours |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Bifidobactéries | $8,2 \pm 0,3$ | $9,3 \pm 0,1$ | $8,6 \pm 0,1$ |
| Bactéroïdes Fragilis | $7,2 \pm 0,5$ | $9,3 \pm 0,1$ | $9,2 \pm 0,1$ |
| Clostridium | $4,3 \pm 0,1$ | $5,1 \pm 0,5$ | $6,7 \pm 0,3$ |

Les résultats sont exprimés en log. et les chiffres représentent la moyenne des résultats des 6 souris ; on constate une augmentation significative de *Bactéroïdes Fragilis* et des *Clostridia*, d'où un risque infectieux.

Les résultats obtenus avec une préparation lactée conforme à l'invention,ensemencée et ayant subi un contact de 8 heures à 37°C avec CNCM I-2219 sont illustrés par le Tableau II ci-dessous.

Tableau II

| | T O | T 7 jours | T 15 jours |
|----------------------|---------------|---------------|------------------------------------|
| Bifidobactéries | $7,1 \pm 0,1$ | $11 \pm 0,5$ | $10,3 \pm 0,8$ |
| Bactéroïdes Fragilis | $8 \pm 0,2$ | $7,9 \pm 0,3$ | nd < 4,7 log |
| Clostridium | $3,9 \pm 0,3$ | $4,4 \pm 0,2$ | 4 (1 souris) 5 autres : absence |
| C. Perfringens | $3,7 \pm 0,9$ | nd | nd |

nd : non déterminé

On constate, par rapport au témoin, une augmentation des Bifidobactéries de 2,5 log et une réduction très importante des Bactéroïdes et des *Clostridia*, notamment après 15 jours d'administration.

Études sur souris monoxéniques à *Clostridium perfringens* :

Objectif : vérifier l'influence des produits conformes à l'invention sur la dissémination des bactéries intestinales dans différents organes.

Condition d'expérimentation : souris axéniques (âge = 8 semaines) maintenues en isolateur stérilisé, alimentées sur la base R03 stérilisée par irradiation.

Produits testés :

- eau ultrapure stérilisée par autoclavage
- eau ultrapure stérilisée par autoclavage additionnée d'une préparation conforme à l'invention (PCI) à raison de 14 g (poids de poudre) pour 100 ml d'eau.

Ces solutions sont préparées stérilement chaque jour et données *ad libitum* aux souris pendant 6 jours. Au terme de cette période, *C. perfringens* souche LAB (origine humaine intestinale) est inoculé à raison de 3,5 à 4,5 log UFC par souris. On mesure l'implantation et la dissémination de *Clostridium perfringens* dans les organes lymphoïdes par sacrifice de deux souris par lot 24, 48 heures, 4 jours et 7 jours après inoculation. Les dénombrements sont effectués par la méthode du nombre le plus probable à trois tubes en milieu LS (incubation 46°C 24-48 heures).

Les résultats sont illustrés par le Tableau III ci-après :

Tableau III

| | J1 | | J2 | | J4 | | J7 | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | PCI | eau | PCI | eau | PCI | eau | PCI | eau |
| Iléon proximal | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| Médian | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| Distal | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| Caecum | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Colon | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Plaques de Peyer | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Ganglions mésentériques | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Bactériémie | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Rate | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| Foie | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Rein | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Poumon | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |

15 Légende du Tableau III :

0 = Faible implantation/dissémination

1 = Implantation/dissémination moyenne

2 = Implantation/dissémination importante

On constate :

20 - un retard d'implantation de 24 heures de *C. perfringens* après administration du produit conforme à l'invention ;

25 - une dissémination dans les organes lymphoïdes faible, chez les souris ayant absorbé le produit conforme à l'invention (PCI).

Ces résultats montrent que les préparations conformes à l'invention régulent la dissémination de *Clostridium perfringens* dans les organes lymphoïdes.

REVENDEICATIONS

1) Procédé de préparation d'un produit lacté immunostimulant, caractérisé en ce que l'on effectue la bioconversion d'un substrat laitier à l'aide d'une culture de *Bifidobacterium*, par maintien dudit substrat en contact avec ladite culture, dans des conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium*.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mise en contact du substrat laitier et des *Bifidobacterium* est effectuée à raison de 1×10^7 à 1×10^9 UFC par ml de substrat laitier, et la population finale de *Bifidobacterium* à l'issue de la réaction de bioconversion est de 1×10^5 à 1×10^9 UFC par ml de produit.

3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le pH du substrat laitier lors de la mise en contact avec les *Bifidobacterium* est de 6,3 à 7 et le pH du produit à l'issue de la réaction de bioconversion est de 6 à 7.

4) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le temps de contact entre le substrat laitier et les bactéries est de 6 à 24 heures.

5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on met en œuvre une culture de *Bifidobacterium* comprenant la souche de *Bifidobacterium breve* déposée le 31 mai 1999, sous le numéro I-2219 auprès de la CNCM.

6) Produit lacté caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon une quelconque des revendications 1 à 5.

7) Produit lacté selon la revendication 6, caractérisé en ce que son pH est de 6 à 7.

8) Aliment lacté obtenu à partir d'un produit selon la revendication 7.

9) Aliment lacté selon la revendication 8, caractérisé en ce que son pH est de 6 à 7,5, de préférence de 6,5 à 6,9.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A23C9/123

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, FSTA, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X | US 5 711 977 A (CHEN MEI-CHING ET AL) 27 January 1998 (1998-01-27) column 6, line 36 - line 39; claims 7-9; examples 2,6 | 1-9 |
| X | DATABASE WPI Section Ch, Week 200002 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 2000-021383 XP002132839 & PH 29 583 A (PHAM C B), 1 April 1996 (1996-04-01) abstract | 1,3,4, 6-9 |
| X | FR 2 506 129 A (VERWALTUNG ORGANI ETS) 26 November 1982 (1982-11-26) | 1,4,6,8 |
| A | example I | 5,7 |
| | -/- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 2000

Date of mailing of the international search report

15/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Saunders, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int lional Application No

PCT/FR 00/01946

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A | EP 0 577 904 A (NESTLE SA) 12 January 1994 (1994-01-12) claims 1,5,7,8; examples | 1,2,6-9 |
| A | US 5 902 578 A (HALPIN-DOHNALEK MARGARET IONE ET AL) 11 May 1999 (1999-05-11) column 4, line 9 - line 12 column 4, line 50 - line 56; claims 1,4 | 1,2,6-9 |
| A | FR 2 560 046 A (SCHULER RUDOLF) 30 August 1985 (1985-08-30) examples | 1,3,6-9 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01946

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 5711977 | A | 27-01-1998 | JP 3017687 B JP 9322762 A | 13-03-2000 16-12-1997 |
| PH 29583 | A | | NONE | |
| FR 2506129 | A | 26-11-1982 | DE 3120505 A BE 533031 A CA 1166065 A CH 315992 A DE 968860 C FR 1111483 A GB 795345 A JP 1030458 B JP 1547476 C JP 58076045 A NL 93350 C NL 8202045 A,B, US 2866470 A US 4435432 A | 09-12-1982 24-04-1984 27-02-1956 20-06-1989 28-02-1990 09-05-1983 16-12-1982 30-12-1958 06-03-1984 |
| EP 0577904 | A | 12-01-1994 | AT 153063 T AT 172245 T AU 673525 B AU 4158793 A CA 2099856 A CZ 9301343 A DE 69219768 D DK 577904 T EP 0768375 A ES 2102485 T FI 933002 A GR 3024219 T HK 1000143 A HU 68567 A IE 80629 B JP 2916350 B JP 6315373 A NO 932408 A NZ 248057 A PL 299542 A RO 115175 A RU 2126446 C SK 71293 A US 5494664 A US 5603930 A | 15-05-1997 15-10-1998 14-11-1996 13-01-1994 07-01-1994 16-02-1994 19-06-1997 27-10-1997 16-04-1997 01-08-1997 07-01-1994 31-10-1997 24-12-1997 28-06-1995 21-10-1998 05-07-1999 15-11-1994 07-01-1994 28-08-1995 21-02-1994 30-11-1999 20-02-1999 06-07-1994 27-02-1996 18-02-1997 |
| US 5902578 | A | 11-05-1999 | WO 9735596 A | 02-10-1997 |
| FR 2560046 | A | 30-08-1985 | DE 3406772 A CH 665126 A | 13-03-1986 29-04-1988 |



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/FR 00/01946

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A23C9/123

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, FSTA, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| X | US 5 711 977 A (CHEN MEI-CHING ET AL) 27 janvier 1998 (1998-01-27) colonne 6, ligne 36 - ligne 39; revendications 7-9; exemples 2,6 | 1-9 |
| X | DATABASE WPI Section Ch, Week 200002 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D13, AN 2000-021383 XP002132839 & PH 29 583 A (PHAM C B), 1 avril 1996 (1996-04-01) abrégé | 1,3,4, 6-9 |
| X A | FR 2 506 129 A (VERWALTUNG ORGANI ETS) 26 novembre 1982 (1982-11-26) exemple I | 1,4,6,8 5,7 |
| | -/- | |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents citées:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Saunders, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Di vide internationale No

PCT/FR 00/01946

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| A | EP 0 577 904 A (NESTLE SA) 12 janvier 1994 (1994-01-12) revendications 1,5,7,8; exemples | 1,2,6-9 |
| A | US 5 902 578 A (HALPIN-DOHNALEK MARGARET IONE ET AL) 11 mai 1999 (1999-05-11) colonne 4, ligne 9 - ligne 12 colonne 4, ligne 50 - ligne 56; revendications 1,4 | 1,2,6-9 |
| A | FR 2 560 046 A (SCHULER RUDOLF) 30 août 1985 (1985-08-30) exemples | 1,3,6-9 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De : de internationale No

PCT/FR 00/01946

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|-------------------------------------------------|---|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 5711977 | A | 27-01-1998 | JP 3017687 B JP 9322762 A | 13-03-2000 16-12-1997 |
| PH 29583 | A | | AUCUN | |
| FR 2506129 | A | 26-11-1982 | DE 3120505 A BE 533031 A CA 1166065 A CH 315992 A DE 968860 C FR 1111483 A GB 795345 A JP 1030458 B JP 1547476 C JP 58076045 A NL 93350 C NL 8202045 A, B, US 2866470 A US 4435432 A | 09-12-1982 24-04-1984 27-02-1956 20-06-1989 28-02-1990 09-05-1983 16-12-1982 30-12-1958 06-03-1984 |
| EP 0577904 | A | 12-01-1994 | AT 153063 T AT 172245 T AU 673525 B AU 4158793 A CA 2099856 A CZ 9301343 A DE 69219768 D DK 577904 T EP 0768375 A ES 2102485 T FI 933002 A GR 3024219 T HK 1000143 A HU 68567 A IE 80629 B JP 2916350 B JP 6315373 A NO 932408 A NZ 248057 A PL 299542 A RO 115175 A RU 2126446 C SK 71293 A US 5494664 A US 5603930 A | 15-05-1997 15-10-1998 14-11-1996 13-01-1994 07-01-1994 16-02-1994 19-06-1997 27-10-1997 16-04-1997 01-08-1997 07-01-1994 31-10-1997 24-12-1997 28-06-1995 21-10-1998 05-07-1999 15-11-1994 07-01-1994 28-08-1995 21-02-1994 30-11-1999 20-02-1999 06-07-1994 27-02-1996 18-02-1997 |
| US 5902578 | A | 11-05-1999 | WO 9735596 A | 02-10-1997 |
| FR 2560046 | A | 30-08-1985 | DE 3406772 A CH 665126 A | 13-03-1986 29-04-1988 |



111

111

Translation
10/019872
5060

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference MJPcb191/161 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/FR00/01946 | International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00) | Priority date (day/month/year) 06 July 1999 (06.07.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A23C 9/123 | | |
| Applicant COMPAGNIE GERVAIS DANONE | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

| | |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Date of submission of the demand 02 February 2001 (02.02.01) | Date of completion of this report 09 August 2001 (09.08.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01946

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-12, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims. Nos. 1-9, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings. sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01946

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|----------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 5 | YES |
| | Claims | 1-4, 6-9 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 5 | YES |
| | Claims | 1-4, 6-9 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-9 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: US-A-5 711 977 (YANG Y.-S. ET AL)

D2: US-A-5 902 578 (HALPIN-DOHNALEK M. I. ET AL)

D3: DATABASE WPI Section Ch, AN 2000-021383 &
PH 29 583 A (PHAM C. B.)

D4: FR-A-2 506 129 (EVOG)

D5: EP-A-0 577 904 (SOCIÉTÉ DES PRODUITS
NESTLÉ S.A.)

D6: FR-A-2 560 046 (SCHULER R. ET AL)

2. The subject matter of independent Claims 1, 6 and 8 is not novel in light of documents D1 and D2, cited in the international search report. It follows that these claims do not fulfil the requirements of novelty defined in PCT Article 33(2).

Document D1 describes a method for preparing a milk product by contacting a dairy substrate with a

Bifidobacterium culture without there being any fermentation, and, as a result, with no acidification of the end product (see column 6, lines 28-47; and columns 9-10, Table V), in particular, for the production of an infant food product. Bioconversion occurs under aerobic conditions; the final population of *Bifidobacterium* is 10^9 CFU/ml; the contact time is 22 hours; and the pH of the product after the reaction is greater than 6 (see columns 9-10, Example 6 and Table V).

Even although document D1 does not indicate or suggest that the *Bifidobacterium* cultures can be used to generate "immunostimulant milk products by means of bioconversion of the dairy substrate", the *Bifidobacterium* strains are added under conditions whereby the milk product is maintained in contact with the bacterial culture for an adequate length of time and under the conditions necessary for there to be a bioconversion reaction of said dairy substrate (see Example 6 and Table V). It follows that, under the conditions described in D1, the bacterial culture is considered to be indeed involved in a bioconversion of the dairy substrate. By the same token, even although it is not disclosed explicitly in D1, the product produced as per the method of D1 is considered to be an "immunostimulant milk product" since the preparation method involves a bioconversion in the presence of a *Bifidobacterium* culture under conditions identical to those defined in the present application.

Document D2 likewise discloses contacting a dairy substrate with a *Bifidobacterium* culture, without any fermentation, for the preparation of an infant

food product (see column 4, lines 5-20 and lines 43-56).

3. Dependent Claims 2-4, 7 and 9 can be accepted only in combination with independent claims defining subject matter that fulfils the requirements of the PCT concerning novelty, inventive step and industrial applicability (PCT Article 33(1)). Furthermore, said claims do not contain any features which, in combination with the features of any one of the claims to which they refer, might define subject matter which fulfils the requirements of the PCT.
4. The subject matter of dependent Claim 5 appears to fulfil the requirements of novelty and inventive step defined in PCT Article 33(2) and 33(3) because the prior art does not anticipate the use of a culture from the *Bifidobacterium breve* strain, deposited under the number I-2219 with the *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes*, for the preparation of a milk product having the acidity and texture features described in the present application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01946

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not indicate the relevant prior art disclosed in documents D1 to D6, nor does it cite said documents.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01946

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

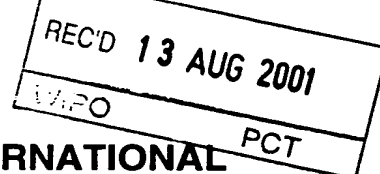
The present Claim 1 lacks clarity (PCT Article 6) because the expression "under conditions that are unfavourable to fermentation by *Bifidobacterium*" is vague and ambiguous and casts doubt on the meaning of the technical features to which it refers. On the basis of the description, it appears to be clear that this expression relates, in particular, to maintaining the culture medium under aerobic conditions (see page 3). However, such aerobic conditions can be favourable to fermentation by *Bifidobacterium* strains with an aerobic metabolism (see document D1). In view of the fact that the conditions that are favourable or unfavourable to fermentation are dependent on the specific strain, the expression "under conditions that are unfavourable to fermentation by *Bifidobacterium*" does not have any concrete meaning. When patentability is dependent on this technical effect, Claim 1 must be drafted in such a way as to indicate all of the technical features of the invention essential for arriving at this technical effect (see the PCT Guidelines III-4.4 in conjunction with IV-7.6; and III-4.3).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)





| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPCb191/161 | voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) | |
| Demande internationale n° PCT/FR00/01946 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/07/2000 | Date de priorité (jour/mois/année) 06/07/1999 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A23C9/123 | | |
| Déposant COMPAGNIE GERVAIS DANONE | | |

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 02/02/2001 | Date d'achèvement du présent rapport 09.08.2001 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Fonctionnaire autorisé Giménez Miralles, J N° de téléphone +49 89 2399 8655  |



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01946

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-12 version initiale

Revendications, N°:

1-9 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01946

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

| | | |
|----------------------------------------|----------------------|---------|
| Nouveauté | Oui : Revendications | 5 |
| | Non : Revendications | 1-4,6-9 |
| Activité inventive | Oui : Revendications | 5 |
| | Non : Revendications | 1-4,6-9 |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications | 1-9 |
| | Non : Revendications | |

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée



Concernant le point V

- 1) Il est fait référence aux documents suivants:

D1: US-A-5 711 977 (YANG Y.-S. ET AL.)

D2: US-A-5 902 578 (HALPIN-DOHNALEK M.I. ET AL.)

D3: DATABASE WPI Section Ch, AN 2000-021383 & PH 29 583 A (PHAM C.B.)

D4: FR-A-2 506 129 (EVOG)

D5: EP-A-0 577 904 (SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A.)

D6: FR-A-2 560 046 (SCHULER R. ET AL.)

- 2) L'objet des revendications indépendantes 1, 6 et 8 n'est pas nouveau à la lecture des documents D1 et D2 cités dans la rapport de recherche internationale. Par conséquent, ces revendications ne sont pas conformes au critère de nouveauté défini par l'article 33(2) PCT.

Le document D1 décrit un procédé de préparation d'un produit lacté par mise en contact d'un substrat laitier avec une culture de *Bifidobacterium* sans fermentation, et donc sans acidification du produit final (voir col.6, l.28-47; et col.9-10, table V), notamment pour l'obtention d'un produit pour l'alimentation infantile. La bioconversion a lieu en conditions aérobies; la population finale de *Bifidobacterium* est de 10^9 UFC/ml; le temps de contact est de 22 heures; et le pH du produit à l'issue de la réaction est supérieur à 6 (voir col.9-10, exemple 6 et table V).

Même si dans le document D1 il n'est pas indiqué ou suggéré que les cultures de *Bifidobacterium* soient utilisées pour générer des "produits lactés immunostimulants par bioconversion du substrat laitier", les souches de *Bifidobacterium* sont ajoutées dans des conditions dans lesquelles le produit laitier est maintenu en contact avec la culture bactérienne pendant un temps suffisant et sous les conditions nécessaires pour qu'une réaction de bioconversion



du dit substrat laitier ait lieu (voir exemple 6 et table V). Il est donc considéré que, dans les conditions décrites dans D1, la culture bactérienne est en fait impliquée dans une bioconversion du substrat laitier. Par analogie, même s'il n'est pas explicitement décrit dans D1, le produit obtenu selon le procédé de D1 est considéré comme étant un "produit lacté immunostimulant" du fait que le procédé de préparation implique une bioconversion en présence d'une culture de *Bifidobacterium* sous des conditions identiques à celles définies dans la présente demande.

Le document D2 divulgue aussi la mise en contact d'un substrat laitier et une culture de *Bifidobacterium*, sans fermentation, pour la préparation d'un produit pour l'alimentation infantile (voir col.4, l.5-20 et l.43-56).

- 3) Les revendications dépendantes 2-4, 7 et 9 ne peuvent être admises que en combinaison avec des revendications indépendantes définissant des objets qui satisfont aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté, l'activité inventive et la susceptibilité d'application industrielle (article 33(1) PCT). Par ailleurs, elles ne contiennent aucune caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des revendications à lesquelles elles se réfèrent, définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT.
- 4) L'objet de la revendication dépendante 5 semble être conforme aux critères de nouveauté et activité inventive définis par les article 33(2) et 33(3) PCT, car l'état de la technique n'anticipe pas la mise en oeuvre d'une culture de la souche *Bifidobacterium breve* déposée sous le numéro I-2219 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes pour la préparation d'un produit lacté ayant les caractéristiques d'acidité et texture telles que décrites dans la présente demande.

Concernant le point VII



Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1(a)(ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 à D6. Par ailleurs, elle ne cite pas ces documents.

Concernant le point VIII

La présente revendication 1 manque de clarté (article 6 PCT), car l'expression "dans des conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium*" est vague et équivoque, et laisse un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles elle se réfère. Il semble clair d'après la description que cette expression se rapporte notamment au maintien du milieu de culture dans des conditions aérobies (voir p.3). Cependant, telles conditions aérobies peuvent être favorables à la fermentation par des souches de *Bifidobacterium* ayant un métabolisme aérobie (voir le document D1). Étant donné que les conditions favorables ou défavorables à la fermentation dépendent de la souche particulière, l'expression "dans des conditions défavorables à la fermentation par *Bifidobacterium*" n'a pas de signification concrète. Lorsque la brevetabilité dépend de cet effet technique, il faut que la revendication 1 soit rédigée de sorte à indiquer toutes les caractéristiques techniques de l'invention essentielles pour arriver à cet effet technique (voir Directives PCT III-4.4 en combinaison avec IV-7.6; et III-4.3).



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 07 mai 2001 (07.05.01) | |
| Demande internationale no PCT/FR00/01946 | Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb191/161 |
| Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 juillet 2000 (06.07.00) | Date de priorité (jour/mois/année) 06 juillet 1999 (06.07.99) |
| Déposant BLAREAU, Jean-Pierre etc | |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

02 février 2001 (02.02.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé Antonia Muller no de téléphone: (41-22) 338.83.33 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|

